



Bel BioLab

Протокол амплификации с использованием Diamant TaqA ДНК полимеразы (с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени).

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть разморожены и хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 25 мкл. Можно также проводить ПЦР в меньших объемах. Для этого уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества.

1. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки.

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
10-кратный буфер G	2,5	1-кратный
дНТФ 10 mM	0,2	0,2 mM
MgCl ₂ 50 mM	1,5 – 2,5	3 - 5 mM
Прямой праймер (10 μM)	1,0	0,4 μM*
Обратный праймер (10 μM)	1,0	0,4 μM*
Двумеченный зонд (10 μM)	0,5	0,2 μM
ДНК матрица	Определяется пользователем	1 pg –10 ng плазмидной, фаговой или ВАС ДНК; 0,1-100,0 ng геномной ДНК
Diamant TaqA (5 U/μl)	0,2 - 0,4	0,04 - 0,016U/μl
H ₂ O	Довести реакционную смесь до 25 мкл	

* - Оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,2 – 1 μM.

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.

3. Условия проведения ПЦР

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Начальная денатурация	95°C	2 мин
40-45 циклов	95°C	10 секунд
	60°C	30 секунд (Считывание флуоресценции)
	67°C	15 секунд